

Original article**Sakarifikasi daun nanas (*Ananas comosus*) dengan lignoselulase dari bakteri endosimbion insang temilok (*Bactronophorus thoracites*)*****Saccharification of Pineapple Leafs (*Ananas comosus*) by Lignocellulase from Endosymbion Bacteria of the Gill of Temilok (*Bactronophorus thoracites*)***Denny Syaputra¹⁾, Khoirul Muslih²⁾

1) Department of Aquaculture, University of Bangka Belitung

2) Department of Water Resource Management, University Bangka Belitung

E-mail : bunk.d3nn2000@gmail.com

Abstract

Wood borer shellfish temilok (*Bactronophorus thoracites*) is a species of clams from family Teredinidae which used the wood as the main source of their food. The gill of temilok is inhabited by bacterias whom able to use the cellulose rich-fiber of the wood. The finding of bacterias which able to produce a cellulose-degrading enzymes was very usefull to improve the saccharification efficiency and effectivity of cellulose-rich material that comes from crops or papers from offices disposal. The aim of the research was to isolate the bacteria from the gill of temilok, and to know the saccharification kinetics of fiber of pineapple leafs by the secreted cellulase from the bacteria in the form of soluted glucose. Isolated bacterias was growth in a sterilized sea water (salinity of 20⁰/∞) at 16-20 °C without the addition of nitrogen sources to get the direct atmospheric dinitrogen-using bacteria. The interaction effects of incubation periods (24, 48, and 72 hours), and substrate concentrations (0,2%, 0,4%, and 0,6%) were investigated by measuring and calculating the concentrations of soluted glucose in the media using phenol-sulfate (phesul) method. Experimental design using factorial completed split plot, and data processing using Microsoft Excell. Variance analyses of soluted glucose concentrations showed that the interactions give no significant effects on soluted glucose concentrations in the media. The highest concentration was 88,1722 ppm (incubation period 72 h, substrate concentration 0,2%), and the lowest was 28,8340 ppm (incubation period 48 h, substrate concentration 0,2%).

Keywords : temilok, bacteria, gill, fiber of pineapple, cellulase, glucose

Pendahuluan

Pemanfaatan limbah pertanian, perkebunan atau olahannya yang mengandung selulosa, hemiselulosa dan lignin (lignoselulosa) merupakan langkah maju dari teknologi sebelumnya dalam mengurangi konflik pemanfaatan bahan pangan sebagai bahan baku bioetanol. Namun demikian, dalam sistem produksi bioetanol generasi kedua ini ternyata masih terdapat beberapa kendala yang harus di atasi. Salah satu kendala di dalam produksi bioetanol generasi kedua ini adalah rendahnya efektivitas sakarifikasi atau tahap hidrolisis lignoselulosa menjadi gula sederhana sebelum fermentasi alkohol. Hal ini merupakan salah satu penyebab rendahnya efisiensi proses dan rendemen bioetanol sekaligus menjadikan riset bertema biokonversi etanol masih terbuka lebar.

Peningkatan efektivitas dan efisiensi sakarifikasi bahan lignoselulotik dapat dilakukan dengan bantuan enzim yang dihasilkan oleh konsorsium bakteri tertentu. Tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat bakteri simbiosis dari insang kerang famili *Teredinidae* yang berpotensi sebagai penghasil enzim pendegradasi lignoselulosa, optimasi kondisi pertumbuhan isolat bakteri tersebut pada suhu tertentu di bawah 35°C dalam kondisi mikroaerobik. Salah satu spesies dari keluarga kerang ini yang banyak hidup di ekosistem mangrove di beberapa wilayah pesisir nusantara adalah tambelo atau temilok (*Bactronophorus thoracites*).

Metode

Penelitian ini dilaksanakan dalam dua tahap yaitu tahap pengisolasian bakteri dari insang temilok, dan tahap analisis produktivitas glukosa di dalam larutan. Tahap pengisolasian bakteri lignoselulotik dilakukan dengan menciptakan kondisi pertumbuhan yang selektif. Kondisi media tanpa penambahan sumber nitrogen menyebabkan bakteri yang dapat bertahan hidup hanyalah yang mampu memfiksasi nitrogen dari atmosfer, serta dapat

tumbuh dalam kondisi mikroaerofilik pada suhu 16-20 °C di dalam larutan air laut dengan salinitas 20‰ pada beberapa kombinasi faktor konsentrasi serat daun nanas (0,2%, 0,4%, dan 0,6%) dan faktor periode waktu inkubasi (24 jam, 48 jam, dan 72 jam) tanpa penambahan sumber nitrogen.

Isolasi bakteri endosimbion insang temilok

Temilok segar yang berasal dari satu individu dengan ukuran panjang 40 cm dan bobot total 20,8 g diambil bagian insangnya dan direndam di dalam larutan campuran air laut steril dan air suling dengan rasio 1:1 (*sea water solution/SWS*), kemudian dihomogenkan dengan *shaker* selama 5 menit. Pengenceran 200 kali dilakukan dengan memindahkan 1 mL larutan rendaman insang yang sudah di-*shaker* ke dalam tabung reaksi berdiameter 1 cm yang berisi 4 mL SWS dan 0,2%, 0,4% dan 0,6% serat daun nanas, tanpa penambahan sumber nitrogen, agar dapat menyeleksi secara tepat bakteri pem-fiksasi nitrogen yang bersifat mikroaerofilik.

Pertumbuhan bakteri lignoselulotik di dalam media

Kondisi pertumbuhan yang selektif dirancang untuk mendapatkan varian bakteri yang mampu tumbuh secara spontan pada kondisi larutan bersalinitas 20 ‰, tanpa penambahan kasein atau sumber nitrogen, serta menggunakan serat daun nanas sebagai sumber tunggal karbon setelah inkubasi 1-3 hari pada suhu 16-20 °C.

Aktivitas hidrolitik serat daun nanas oleh enzim bakteri

Bentuk koloni bakteri lignoselulotik sulit diamati ketika dikultur dalam medium cair, sehingga mempengaruhi penghitungan jumlah koloni yang tepat dengan metodologi *plating* biasa. Oleh karena itu, pertumbuhan bakteri pada media cair yang berisi masing-masing 0,2%, 0,4% dan 0,6% (b/v) daun nanas pada suhu dan pH optimal dihitung dengan menentukan konsentrasi glukosa total dalam kultur. Setelah ditumbuhkan selama 1, 2 dan 3

hari pada suhu 16-20 °C dan salinitas 20‰, setiap larutan di dalam tabung reaksi tersebut digunakan untuk menentukan konsentrasi glukosa tiap kombinasi perlakuan.

Analisis glukosa (Metode Fesul [Bennet et al. 2007]).

Aktivitas hidrolisis serat daun nanas oleh lignoselulase di dalam media diketahui dari pembentukan glukosa dalam jumlah tertentu yang diukur dengan pereaksi *fenol-sulfat* atau fesul. Bennet et al. (2007) menggunakan pereaksi fesul sebagai metode karakterisasi glukosa dan glikogen terbaik secara spektrofotometri pada panjang gelombang 490nm. Nilai absorbansi pada panjang gelombang 490nm dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar dimana y adalah nilai A_{490} dan x adalah konsentrasi glukosa sampel (ppm).

Rancangan percobaan yang digunakan di dalam penelitian ini yaitu Rancangan Acak Lengkap Faktorial, dimana faktor pertama yaitu lama waktu inkubasi dengan tiga taraf (24, 48, dan 72 jam), dan faktor kedua adalah konsentrasi substrat serat daun nanas (b/v) dengan tiga taraf (0,2%, 0,4% dan 0,6%). Jika hasil analisis ragam menunjukkan nilai F hitung > F tabel atau H_0 ditolak maka analisis dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Jujur untuk mendapatkan perlakuan lama inkubasi (jam) dan konsentrasi substrat (%) terbaik.

Hasil dan Pembahasan

Konsentrasi Glukosa (ppm) Selama Masa Inkubasi

Pada jam ke-24 masa inkubasi, sejumlah glukosa terlarut terdeteksi di dalam media dengan rata-rata konsentrasi sebesar 70,75 ppm (Tabel 1). Jika dibandingkan dengan glukosa di dalam larutan kontrol negatif dengan rata-rata konsentrasi sebesar 38,06 ppm pada jam ke-24, maka glukosa yang terlarut di dalam media menunjukkan adanya aktivitas selulolitik oleh isolat bakteri endosimbion insang temilok. Serat nanas dapat dimanfaatkan oleh bakteri tersebut

sebagai sumber energi bagi pertumbuhannya. Bakteri tersebut dapat memanfaatkan substrat serat nanas sebagai dengan mensekresi satu atau lebih enzim yang aktif terhadap selulosa.

Tabel 1 Konsentrasi glukosa (ppm) pada jam ke-24 masa inkubasi.

Perlakuan		Lama Inkubasi (24jam)				\bar{x}
		Kontrol Negatif	Ulangan			
			1	2	3	
Kons.	0,2	32,37	72,76	58,25	53,35	61,46
Substrat	0,4	26,88	79,24	60,51	83,55	74,43
(%)	0,6	54,92	80,22	65,51	83,35	76,36
\bar{x}		38,06	77,41	61,26	73,42	70,75

Media dengan konsentrasi substrat serat nanas yang lebih tinggi cenderung menghasilkan glukosa terlarut yang lebih tinggi pula pada 24 jam pertama masa inkubasi. Rataan konsentrasi glukosa pada perlakuan konsentrasi serat nanas 0,2% sebesar 61,46 ppm lebih rendah 19,5156% dibandingkan dengan konsentrasi glukosa pada perlakuan konsentrasi serat nanas 0,6% sebesar 76,36 ppm. Kecenderungan ini dapat disebabkan oleh permukaan substrat yang dapat diakses oleh bakteri semakin luas dengan meningkatnya konsentrasi substrat di dalam media sehingga kontak antara substrat dan enzim yang disekresikan bakteri selama 24 jam pertama masa inkubasi menjadi lebih banyak.

Pada jam ke-48 masa inkubasi, diperoleh sejumlah glukosa terlarut di dalam media dengan rata-rata konsentrasi sebesar 42,67 ppm (Tabel 2). Jika dibandingkan dengan glukosa di dalam larutan kontrol negatif dengan rata-rata konsentrasi sebesar 24,12 ppm pada jam ke-48, maka larutan glukosa yang terbentuk di dalam media menunjukkan adanya aktivitas selulolitik oleh isolat bakteri endosimbion insang temilok, meskipun nilai ini tidak setinggi konsentrasi glukosa pada 24 jam pertama masa inkubasi, atau menurun sebesar 39,6390%. Penurunan ini dapat disebabkan oleh perubahan yang terjadi di dalam media seiring dengan kondisi suhu media yang semakin stabil pada rentang suhu yang sempit dan relatif lebih rendah daripada suhu kamar yaitu 16-20 °C sehingga tingkat pemanfaatan glukosa di dalam

media untuk mendukung pertumbuhan bakteri juga semakin tinggi. Bakteri yang sedang beradaptasi terhadap kondisi lingkungannya menyebabkan laju konsumsi glukosa terlarut meningkat sehingga konsentrasi glukosa di dalam media mengalami penurunan. Hal ini dapat juga disebabkan oleh kebutuhan energi bakteri untuk mengatasi persaingan dengan mikroorganisme lain yang ada di dalam larutan yang bersumber dari biakan isolat yang tidak murni, dan substrat serat nanas yang tidak steril.

Tabel 2 Konsentrasi glukosa (ppm) pada jam ke-48 masa inkubasi.

Perlakuan		Lama Inkubasi (48 jam)				\bar{x}
		Kontrol Negatif	Ulangan			
			1	2	3	
Kons.	0,2	14,25	29,53	30,90	26,07	28,83
Substrat	0,4	25,19	28,02	34,49	36,33	32,95
(%)	0,6	32,94	52,04	70,51	76,17	66,24
\bar{x}		24,12	36,53	45,30	46,19	42,67

Media dengan konsentrasi substrat serat nanas yang lebih tinggi cenderung mengandung glukosa terlarut yang lebih banyak pula pada 48 jam pertama masa inkubasi. Kecenderungan ini sama dengan yang terjadi pada 24 jam pertama masa inkubasi. Rataan konsentrasi glukosa pada perlakuan konsentrasi serat nanas 0,2% sebesar 28,83 ppm lebih rendah 56,4684% dibandingkan dengan konsentrasi glukosa pada perlakuan konsentrasi serat nanas 0,6% sebesar 66,24 ppm. Kecenderungan ini dapat disebabkan oleh semakin luasnya permukaan substrat yang dapat diakses oleh bakteri sehingga kontak antara enzim yang disekresikan bakteri dan substrat selama 48 jam pertama masa inkubasi lebih banyak jumlahnya.

Pada jam ke-72 masa inkubasi, diperoleh sejumlah glukosa terlarut di dalam media dengan rata-rata konsentrasi sebesar 61,51 ppm (Tabel 3). Konsentrasi ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan glukosa di dalam larutan kontrol negatif dengan rata-rata konsentrasi sebesar 34,28 ppm pada jam ke-72. Larutan glukosa yang terbentuk di dalam media menunjukkan adanya aktivitas selulolitik oleh isolat bakteri simbiosis insang temilok, meskipun

nilai ini tidak setinggi konsentrasi glukosa pada 24 jam pertama masa inkubasi, namun lebih tinggi 44,1351% daripada konsentrasi glukosa pada 48 jam pertama masa inkubasi. Peningkatan ini menunjukkan bahwa sebagian besar bakteri yang hidup di dalam media telah melalui fase adaptasi setelah jam ke-48 masa inkubasi sehingga pada jam ke-72 laju pemanfaatan substrat sebagai sumber energi mengalami percepatan.

Tabel 3 Konsentrasi glukosa (ppm) pada jam ke-72 masa inkubasi.

Perlakuan		Lama Inkubasi (72 jam)					\bar{x}
		Kontrol Negatif	Ulangan				
			1	2	3		
Kons.	0,2	25,78	206,78	30,12	27,62	88,17	
Substrat	0,4	38,78	72,45	40,62	33,95	49,01	
(%)	0,6	38,28	39,12	43,62	59,28	47,34	
\bar{x}		34,28	106,12	38,12	40,28	61,51	

Media dengan konsentrasi substrat serat nanas yang lebih tinggi cenderung menghasilkan glukosa terlarut yang lebih rendah pada 72 jam pertama masa inkubasi. Kecenderungan ini berbeda dengan yang terjadi pada 24 dan 48 jam pertama masa inkubasi. Rataan konsentrasi glukosa pada perlakuan konsentrasi serat nanas 0,2% sebesar 88,17 ppm lebih tinggi 86,2574% dibandingkan dengan konsentrasi glukosa pada perlakuan konsentrasi serat nanas 0,6% sebesar 47,34 ppm. Kecenderungan ini dapat disebabkan oleh pertambahan jumlah bakteri di dalam media yang tidak disertai dengan penambahan substrat mengakibatkan glukosa yang dikonsumsi bakteri untuk mendukung pertumbuhannya lebih banyak daripada yang terlarut di dalam media.

Analisis Ragam Konsentrasi Glukosa Hasil Interaksi Perlakuan

Hasil analisis ragam data konsentrasi glukosa terlarut di dalam media menunjukkan bahwa perlakuan lama inkubasi yang dicobakan (24 jam, 48 jam, dan 72 jam) tidak berpengaruh nyata terhadap konsentrasi glukosa terlarut di dalam media. Kondisi optimal pertumbuhan bakteri endosimbiosis insang temilok di dalam

media hingga jam ke-72 belum dicapai. Silva *et al.* (2009) melaporkan bahwa pertumbuhan maksimum bakteri endosimbion pada keluarga kerang pengebor kayu (*Teredinidae*) secara *in vitro* baru dicapai setelah diinkubasi selama 4 hari.

Konsentrasi substrat yang dicobakan (0,2%, 0,4%, dan 0,6%) juga tidak berpengaruh nyata terhadap konsentrasi glukosa yang terlarut di dalam media. Interaksi perlakuan lama inkubasi dan konsentrasi substrat juga tidak berpengaruh nyata terhadap konsentrasi glukosa yang terlarut di dalam media.

Percobaan yang cukup terandal sebaiknya diusahakan nilai koefisien keragaman tidak melebihi 20% (Gaspersz 1991). Nilai koefisien keragaman di dalam penelitian ini adalah 55,67%. Keterandalan data konsentrasi glukosa yang diperoleh dari penelitian ini masih relatif rendah untuk menyajikan informasi yang cukup mengenai aktivitas enzim lignoselulase dari isolat bakteri endosimbion insang temilok.

Kesimpulan

Bakteri yang diisolasi dari insang temilok memperlihatkan aktivitas perombakan selulosa (selulolitik) di dalam media air laut steril bersalinitas 20‰ pada suhu antara 16-20 °C dan tanpa penambahan sumber nitrogen. Bakteri tersebut dapat memanfaatkan substrat serat nanas dengan mensekresi enzim yang aktif terhadap selulosa. Laju hidrolisis selulosa oleh bakteri simbiosis insang temilok tidak dapat dijelaskan secara kuantitatif dengan metode di dalam penelitian ini. Konsentrasi substrat yang optimal di dalam media juga tidak dapat diketahui dari penelitian ini karena isolat bakteri endosimbion insang temilok yang digunakan bukan berasal dari biakan murni. Biakan yang tidak murni dan substrat yang tidak steril meningkatkan potensi kehadiran jenis-jenis mikroorganisme lain di dalam media. Kehadiran jenis-jenis organisme lain di dalam media meningkatkan kompetisi sehingga memperpanjang fase adaptasi. Kombinasi perlakuan masa inkubasi (1, 2, dan 3 hari), dan

konsentrasi substrat (0,2%, 0,4%, dan 0,6%), baik individual maupun interaksinya tidak berpengaruh nyata terhadap konsentrasi glukosa terlarut. Hal ini menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri endosimbion insang temilok secara *in vitro* pada hari ke-3 belum optimum.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini dilaksanakan dengan pembiayaan penuh dari Biaya Operasional Perguruan Tinggi Negeri Universitas Bangka Belitung 2013, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia.

Daftar Pustaka

- Bennet, LW., RW Keirs, ED Peebles, PD Gerard. 2007. Methodologies of Tissue Preservation and Analysis of the Glycogen Content of the Broiler Chick Liver. *Poultry Science* 86:2653-2665.
- Gaspersz V. 1991. *Metode Perancangan Percobaan untuk Ilmu-ilmu Pertanian, Ilmu-ilmu Teknik, dan Biologi*. Bandung : Armico.
- Howard RL, Abotsi E, van Rensburg JEL, and Howard S. 2003. Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production. *Afr. J. Biotechnol.* 2(12) : 602-619.
- International Energy Agency. 2011. *Technology Roadmap :Biofuels for Transport* [Paper]. (www.iea.org/papers/2011/biofuels_roadmap.pdf). (05 Mei 2012).
- Li, Y.H., M. Ding, J. Wang, G.J. Xu and F. Zhao. 2006. A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose degrading bacterium, *Bacillus* sp. AC-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 430-436.

- Mesa L, Gonzalez E, Cara C, Gonzalez M, Castro E, Mussatto SI. 2011. The effect of organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Chemical Engineering Journal*. 168 : 1157-1162.
- Osman ME, Khattab OH, Hammad IA, and El-Hussieny NI. 2011. Optimization of Bio-fuel production by *Saccharomyces cerevisiae* isolated from sugarcane bagasse. *Journal of American Science*. 7(5) : 485-492.
- Purchon RD. 1968. *The Biology of The Mollusca*. Hungary : Pergamon Press.
- Science Daily. 2010. More Economical Process for Making Ethanol from Nonfood Sources
<http://www.sciencedaily.com/releases/2010/03/100325121952.htm> (13 Mei 2012).
- Saha S, Roy RN, Sen SK, Ray AK. 2006. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). *Aquaculture Research*. 7(4) : 380-388.
- Silva JPA, Mussatto SI, Roberto IC and Teixeira JA. 2011. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 28(01):151-156.
- Sousa Jr. R, Carvalho ML, Giordano RLC, and Giordano RC. 2011. Review :Recent trends in the modeling of cellulose hydrolysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 28(4): 545-564.
- Steel R G D. and J H Torrie, 1993, *Prinsip dan Prosedur Statistik*. Terjemah: Bambang Sumantri. Jakarta : Penerbit Gramedia.
- Syaputra D, Ibrahim B, Poernomo D. 2007. Produk fermentasi ikan dari cacing kapal (*Bactronophorus* sp) segar. *Jurnal Akuatik*. 1:12-14.
- Syaputra D dan Widodo PT. 2012. Karakteristik glikogen untuk *carrier* DNA yang diekstrak dari daging temilok (*Bactronophorus thoracites*) bermutu rendah. [Tidak dipublikasikan].
- Silva de AET and Ferreira EM *et al*. 2009. Physiological traits of the symbiotic bacterium *Teredinibacter turnerae* isolated from the mangrove shipworm *Neoteredo reynei*. *Genetics and Molecular Biology*. 32 (3) : 572-581.
- Yang JC *et al*. 2009. The Complete Genome of *Teredinibacter turnerae* T7901: An Intracellular Endosymbiont of Marine Wood-Boring Bivalves (Shipworms). *PLoS ONE* 4(7): e6085.
doi:10.1371/journal.pone.0006085.4:1-17

